

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-163379

(43)Date of publication of application : 10.06.2004

(51)Int.Cl. G01N 33/50
// G01N 30/88

(21)Application number : 2002-361471

(71)Applicant : RESEARCH FOUNDATION ITSUU
LABORATORY

(22)Date of filing : 11.11.2002

(72)Inventor : SHUDO KOICHI
KAGECHIKA HIROYUKI
KADOWAKI TAKASHI
YAMAUCHI TOSHIMASA

(54) METHOD OF DIAGNOSING DIABETES

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To find a useful factor for diagnosing diabetes, and to provide a method for diagnosing diabetes using the same, which is clinically useful.

SOLUTION: The method for diagnosing diabetes predicts the degree of progress and the degree of the seriousness of diabetes illness, by measuring the concentration of a retinoic acid in the blood of a diabetes subject, thereby obtaining useful information for the selection of the method of treatment.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

TECHNICAL FIELD

[The technical field to which invention belongs] This invention relates to the diagnostic approach useful to a diagnosis of human diabetes mellitus.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs] This invention relates to the diagnostic approach useful to a diagnosis of human diabetes mellitus.

[Description of the Prior Art] At least 30 million diabetics get down all over the world, and the number of patients is increasing with aging of current and rapid population today. And the increase of the further number of patients will be predicted from now on. Also in Japan, as for this inclination, not an exception but current and about 7 million people are suffered from diabetes mellitus, and, several years after, that number is considered that it will amount to 10 million people.

[0002]

Although performed by blood sugar level measurement of after [a sugar load] 1 hour and/or in the blood sugar level measurement at the time of hungry, and 75g oral carbohydrate tolerance test, and 2 hours, since the diagnostic approach of the diabetes mellitus and the prediabetic state which are performed clinically now needs to carry out multiple-times extraction of the blood about one diagnosis, it gives a test subject pain. Moreover, HbA1c (GURUKO hemoglobin) concentration is widely used for the diagnosis of diabetic severity. Hemoglobin is what was combined with the glucose in blood nonenzymatic, and since HbA1c generates depending on the glucose concentration in blood, it is not influenced by temporary physiology condition reflecting the blood sugar level for one to two months before an inspection time. Therefore, since diabetic severity is expressed correctly and it becomes the good index of blood sugar control, it has been an indispensable index in a diabetic therapy.

[0003]

Although decision of a stadium is important in a diabetic therapy, decision of a stadium is synthetically made by the clinical view including the above-mentioned approach, it is hard to say that it has sufficient objectivity, and the diagnostic approach based on a new index is desired.

Although diabetes mellitus is a kind of a metabolic disease and is characterized by chronic hyperglycemia, in addition to this, there are abnormalities characteristic of the saccharometabolism, lipid metabolism, proteometabolism, etc.

[0004]

For example, in I-beam diabetes mellitus, the inclination for the blood drug concentration of retinol to fall rather than healthy people is accepted (for example, nonpatent literature 1, 2 reference). On the other hand, it is known that the inclination for the blood drug concentration of retinol to rise rather than healthy people in II type <2> diabetes mellitus will be accepted (for example, nonpatent literature 3, 4 reference). However, the relation between the blood drug concentration of retinol, diabetes mellitus, and its complication is not clear.

[0005]

It is peroxisome as a receptor in a nucleus which activates the peroxisome which is one of the intracellular organelles which is participating in disassembly of a fat in recent years with the compound which has multiplication. proliferator activated receptor (PPAR) was identified. This PPAR is retinoid.

X Forming receptor (RXR) and a dimer and acting as a transcription factor of a gene is known (for example, nonpatent literature 5 reference). Although three sorts of subtypes, alpha, beta, and gamma, are known by PPAR, especially PPARgamma has played the role important for differentiation of a fat cell, and it is clear to have the operation which raises a diabetic's insulin susceptibility further. Although the physiological ligand of PPARgamma in the living body is still unknown, about RXR, the 9-cis--retinoic acid which is one of the metabolite of retinol is considered to be physiological ligand. Moreover, the all transformer retinoic acid which is similarly one of the metabolite of retinol is considered to be the factor which checks differentiation of a fat cell (for example, nonpatent literature 6, 7 reference).

[Nonpatent literature 1] Tohoku journal of experimental medicine, 1986, the 149th volume, p.133-143.

[Nonpatent literature 2] The American journal of clinical nutrition, 1989, the 50th volume, p.329-331.

[Nonpatent literature 3] International journal for vitamin and nutrition research = Journal international de vitaminologie et de nutrition, 1991, the 61st volume, p.328-333.

[Nonpatent literature 4] American journal of the medical sciences. N.S., 1995, the 310th volume, p.177-182.

[Nonpatent literature 5] Nature, 2000, the 405th volume, p.421-424.

[Nonpatent literature 6] Differentiation, 1982, the 23rd volume, p.164-169.

[Nonpatent literature 7] Molecular and cellular biology, 1997, the 17th volume, p.1552-1561.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The technical problem of this invention is finding out a useful new factor to a diabetic diagnosis, and is a thing which used this and for which the useful diabetes-mellitus diagnostic approach is offered clinically.

[0007]

[Means for Solving the Problem] this invention persons came to complete this invention, as a result of advancing research wholeheartedly that the above-mentioned technical problem should be solved.

[0008]

That is, it is the diagnostic approach of the diabetes mellitus characterized by making retinoic acid concentration in blood into an index.

[0009]

Furthermore, it is the diabetes-mellitus diagnostic approach characterized by this retinoic acid being an all transformer retinoic acid.

[0010]

[Embodiment of the Invention] In spite of the role with the RECHINON acid important in the living body which is active metabolite of retinol, any examination was not made about the RECHINON acid concentration in blood, and diabetic relation, either. this invention persons traced that the retinoic acid concentration in blood and relation fixed to diabetic symptoms were seen, and the diagnostic approach of the diabetes mellitus characterized by the retinoic acid concentration in blood measuring was completed. That is, by measuring the retinoic acid concentration in a diabetic's blood, extent and severity of a diabetic advance can be predicted and useful information can be acquired to selection of the therapy approach.

The correlation of extent of a diabetic advance and HbA1c concentration is known well. Since retinoic acid concentration and HbA1c concentration correlated, it became clear that retinoic acid concentration correlates with extent of a diabetic advance. In this way, the diagnostic approach of new and useful this invention of diagnosing advance extent of the diabetes mellitus by measurement of retinoic acid concentration was completed.

As a measuring method of the retinoic acid concentration in blood, various approaches can be considered for this contractor. High performance liquid chromatography-mass spectrometry (liquid chromatography-mass spectrometry) or the approach by high performance chromatography (HPLC) is simplicity, high sensitivity, and high degree of accuracy, and is desirable. Although measurement by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) also has indispensable derivatization of a measurement sample, they are high sensitivity and high degree of accuracy. Moreover, the fluorometric analysis using an antigen-antibody reaction is also practical.

[0011]

It is also possible to measure, after pretreating the blood used as the measuring object by the suitable approach on the occasion of measurement of the retinoic acid concentration in blood by HPLC. By pretreating, it attains [high sensitivity and highly precise measurement] more and is desirable. In pretreatment, it can depend and distribute to the deproteinization by centrifugal separation, an organic solvent, etc., the extract by the organic solvent, an acid, or a base, and known approaches, such as use of an aminopropyl column, can be combined with arbitration.

[0012]

as the column support used for HPLC -- a normal phase system and an opposition system -- although either can be used, separation is good and is more desirable. [of the opposition systems, such as an ODS column,]

[0013]

As the detection approach in HPLC, although any of the known detection approach are sufficient, the approaches by absorption of ultraviolet rays or fluorometry are simple and high sensitivity, and are desirable. Moreover, selectivity and sensibility can also be raised by changing absorption intensity, absorption wavelength, fluorescence intensity, etc. by derivatizing a retinoic acid.

[0014]

Although an example explains the diagnostic approach of the diabetes mellitus by measurement of the retinoic acid concentration in blood in this invention below at a detail, this invention is not limited to an example.

[0015]

[Example]

(1) Preparation of a blood serum

About 10ml of blood was extracted in the Sekisui Chemical INSE pack (a blood serum separating medium is entered [a coagulation accelerator (thrombin),]), at the room temperature, the at-long-intervals alignment was carried out 3000 rpm at 4 degrees C after neglect for 10 minutes for about 1 hour, and the blood serum was moved to the polypropylene tube. It extracted after preservation at an extract or -20 degrees C immediately on several by the extract approach described below using 1ml among those.

[0016]

(2) Extract operation

In the following actuation, the sample was dealt with under protection-from-light conditions. For the 10ml brown-with screw cap test tube which carried out argon inert gas replacement of the 1ml of the blood serums, ethanol 2ml was added and at-long-intervals alignment separation was carried out 1800 rpm at the room temperature after the vortex for 5 minutes. the 10ml pickpocket who put in 2ml (pH4.5) of 100mM ammonium acetate water solutions, and did argon inert gas replacement of the supernatant liquid beforehand -- it moved to the with test tube. After adding n-hexane / 5ml (9/1) of ethyl acetate there and shaking violently, at the room temperature, 1800 rpm, at-long-intervals alignment separation was carried out for 3 minutes, the test tube was soaked in the acetone into which dry ice was put, and the water layer was frozen. After putting on the aminopropyl column (ISOLUTE NH2,500mg / 3ml, International Sorbent Technology, UK) which carried out conditioning of the organic layer by n-hexane / 2ml (9/1) of ethyl acetate and carrying out sequential washing by diethylether 1ml twice by chloroform / n-hexane / 2ml [of ethyl acetate] (9/1), and 2-propanol (2/1) 2ml, elution of the retinoic acid was carried out by diethylether 2ml which contains an acetic acid 3%. This fraction was condensed under the argon gas air current, and it dried. Ethanol 50microl was added here, and it dissolved, and analyzed in HPLC.

[0017]

(3) HPLC analysis

HPLC analysis was performed by connecting an ultraviolet-rays detector (Shimadzu, SPD-10A) and an integrator (Shimadzu, CR-8A) to a Shimadzu LC-10AS pump. A column is COSMOSIL. 4C18-AR-II (250x4.6mm, 5 micrometers, Nakarai Tesuku make) was used at the room temperature.

[0018]

It was eluted by part for 0.6ml/of the rates of flow a solvent A:acetonitrile / methanol / 2% at 0-60% (8 to 14 minutes), 60-70% (14 to 16 minutes), and 70% (16 to 38 minutes) a gradient presentation (content of Solvent B), and 0% (0 to 8 minutes), using an acetic acid (60/16/24, v/v/v) and a solvent B:acetonitrile as a mobile phase. Detection was performed in 345nm.

[0019]

(4) The quantum of a retinoic acid

Retinoic acid preparations were added and collected into the blood serum, and the calibration curve created them into it. Linearity ($R^2 > 0.999$) with a coefficient of dispersion good at 10% or less was acquired. The extraction efficiency of a retinoic acid was presumed to be 80%, and, in the case of the all transformer retinoic acid, in the case of :0.27ng/ml, 0.08 ng/ml, and a 13-cis- retinoic acid, the limit of determination (LOQ) and limit of detection (LOD) were presumed to be :0.22ng/ml and 0.07 ng/ml, respectively in the case of :0.44ng/ml, 0.13 ng/ml, and a 9-cis- retinoic acid.

[0020]

(5) Biochemical inspection

Blood sugar level: It measured immediately after blood collecting with the small blood-sugar-determination machine (electrode: guru test sensor).

[0021]

SRL and Inc. were requested about the quantum of HbA1c, and TC (total cholesterol), HDLC (HDL cholesterol), TG (triglyceride) and FFA (free fatty acid).

[0022]

[The example 1 of measurement]

The result of having measured [healthy persons / six] the diurnal variation of the retinoic acid concentration in blood for the result of having measured the daily variation of the retinoic acid concentration in blood 4 times every 3 hours, 4 times over three weeks to Table 1 about four healthy persons was shown in Table 2.

[0023]

[Table 1]

血中レチノイン酸濃度の日内変動

	平均値 (データ範囲)	変動係数 (SD)	p 値
オールトランスレチノイン酸 (ATRA)	1. 7 2 n g / m l (1. 3 2 - 2. 2 5)	1 9. 7 % (4. 5)	0. 5 1
1 3 - シスレチノイン酸 (1 3 c R A)	2. 1 0 n g / m l (1. 6 2 - 3. 0 0)	1 1. 8 % (8. 2)	0. 0 5 3
血中グルコース (B G)	9 0. 8 m g / d l (8 4 - 1 0 5)	5. 3 % (2. 3)	0. 5 4
トリグリセリド (T G)	7 6. 3 m g / d l (4 2 - 1 3 7)	2 5. 7 % (4. 5)	0. 1 8
遊離脂肪酸 (F F A)	0. 4 5 m E Q / l (0. 1 2 - 1. 1 6)	6 7. 1 % (1 3. 2)	< 0. 0 0 0 1

[0024]

[Table 2]

血中レチノイン酸濃度の日間変動

	平均値 (データ範囲)	変動係数 (SD)	p 値
オールトランスレチノイン酸 (ATRA)	1. 8 1 n g / m l (1. 4 0 - 2. 3 4)	1 1. 0 % (4. 5)	0. 7 4
1 3 - シスレチノイン酸 (1 3 c R A)	1. 9 5 n g / m l (1. 6 1 - 2. 3 1)	8. 4 % (4. 7)	0. 9 0
血中グルコース (BG)	9 2. 8 m g / d l (8 2 - 1 0 9)	6. 4 % (1. 3)	0. 0 5 3
総コレステロール (TC)	1 8 5. 2 m g / d l (1 4 3 - 2 7 9)	6. 2 % (5. 6)	0. 2 2
HDLコレステロール (HDL C)	6 5. 6 m g / d l (3 2 - 9 8)	6. 7 % (3. 1)	0. 1 6
トリグリセリド (TG)	6 8. 6 m g / d l (3 8 - 1 4 3)	2 5. 5 % (1 9. 2)	0. 0 7 1
遊離脂肪酸 (F F A)	0. 3 8 m E Q / l (0. 1 6 - 0. 6 8)	3 5. 3 % (1 3. 4)	0. 3 1

[0025]

[The example 2 of measurement]

The measurement result of the retinoic acid concentration in blood about 18 healthy persons and 13 II mold diabetics was shown in Table 3 and Table 4.

[0026]

[Table 3]

	健常者	糖尿病患者	p 値
性別 (男性/女性)	14 / 4	11 / 2	
年齢	32.8 ± 7.9 (n=18)	56.7 ± 15.5 (n=13)	0.0001
BMI (KG/m ²)	21.2 ± 1.7 (n=18)	22.7 ± 4.3 (n=13)	0.286
総コレステロール (TC) (mg/dl)	190 ± 33 (n=17)	186 ± 33 (n=13)	0.756
HDLコレステロール (HDL C) (mg/dl)	63.5 ± 11.3 (n=17)	54.4 ± 12.4 (n=11)	0.057
トリグリセリド (TG) (mg/dl)	136 ± 273 (n=16)	118 ± 81 (n=13)	0.077
血中グルコース (BG) (mg/dl)	98.5 ± 7.0 (n=17)	139 ± 33 (n=13)	0.006
HbA1c (%)	4.59 ± 0.14 (n=7)	6.75 ± 1.24 (n=13)	<0.0001
オールトランスレチノ イン酸 (ATRA) (ng/ml)	2.08 ± 0.53 (n=18)	1.76 ± 0.54 (n=13)	0.092
13-シスレチノイン 酸 (13cRA) (ng/ml)	2.05 ± 0.26 (n=18)	1.77 ± 0.39 (n=13)	0.093
ATRA+13cRA (ng/ml)	4.13 ± 0.61 (n=18)	3.54 ± 0.86 (n=13)	0.033

[0027]

[Table 4]

変数 1	変数 2	相関係数 (r)
年齢	A T R A	- 0 . 6 9 *
年齢	1 3 c R A	- 0 . 5 2
年齢	H b A 1 c	- 0 . 2 4
H b A 1 c	A T R A	0 . 5 7 *
H b A 1 c	1 3 c R A	0 . 6 2 *
H b A 1 c	B G	0 . 3 7
H b A 1 c	T C	0 . 6 1 *
H b A 1 c	H D L C	0 . 1 5
A T R A	T C	0 . 4 3
A T R A	H D L C	0 . 2 9
A T R A	1 3 c R A	0 . 7 4 **
1 3 c R A	T C	0 . 3 1
1 3 c R A	H D L C	0 . 6 1

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

[0028]

[Effect of the Invention] From Table 1 and 2, if coefficient of variation is compared, the diurnal variation within the day of the blood drug concentration of a retinoic acid will be stable to the same extent as the blood drug concentration of blood glucose, total cholesterol, and HDL cholesterol. On the other hand, concentration fluctuation of a triglyceride and free fatty acid is larger than concentration fluctuation of a retinoic acid. That is, between the days within a day are stopped low and blood-drug-concentration fluctuation of a retinoic acid is useful as an index of an illness diagnosis.

[0029]

Furthermore, II mold diabetic's retinoic acid concentration in blood has an inclination lower than a healthy person from Table 3. However, it cannot deny that this is based on the difference in the age distribution of II mold diabetic group and a healthy person group. The difference by the age distribution is not accepted in the index of other fats.

[0030]

From Table 4, correlation is accepted in the HbA1c concentration used as a diabetic index, and the blood drug concentration of a retinoic acid. That is, generally, since HbA1c concentration has advance extent and diabetic severity, and diabetic relation, it turns out that retinoic acid concentration is connected with diabetic advance extent and severity. Although total cholesterol and correlation are accepted, as for HbA1c concentration, correlation is not accepted to be age here.

[0031]

Moreover, especially correlation is not accepted to be the blood drug concentration of a retinoic acid, and other fat indexes in blood.

The retinoic acid concentration in blood became clear [the thing useful as an index of a new diabetes-mellitus diagnosis which is not known until now] from the above result.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]

The diagnostic approach of the diabetes mellitus characterized by making retinoic acid concentration in blood into an index.

[Claim 2]

The diabetes-mellitus diagnostic approach according to claim 1 characterized by this retinoic acid being an all transformer retinoic acid.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-163379

(P2004-163379A)

(43) 公開日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int.Cl. ⁷	F 1	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	2 GO 4 5
// GO 1 N 30/88	GO 1 N 30/88	E

審査請求 未請求 請求項の数 2 書面 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2002-361471 (P2002-361471)	(71) 出願人	591063648 財団法人乙卯研究所 東京都世田谷区玉川2丁目28番10号
(22) 出願日	平成14年11月11日(2002.11.11)	(72) 発明者	首藤 紘一 東京都世田谷区下高井戸五丁目9番地18号
特許法第30条第1項適用申請有り		(72) 発明者	影近 弘之 東京都練馬区大泉二丁目39番地6号
		(72) 発明者	門脇 孝 神奈川県川崎市麻生区片平三丁目16番地14号
		(72) 発明者	山内 敏正 東京都文京区向丘一丁目3番地1号605号室

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病の診断方法

(57) 【要約】

【課題】 新規な糖尿病診断方法の提供。

【解決手段】 血中レチノイン酸濃度を指標とすることを特徴とする糖尿病の診断方法。

【選択図】 なし

【請求項 1】

【請求項 2】

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【従来の技術】今日、世界中で少なくとも３０００万人の糖尿病患者がおり、現在、急速な人口の高齢化に伴い、その患者数は増加している。そして、今後、さらなる患者数増が確実視されている。この傾向は、日本においても例外ではなく、現在、約７００万人が糖尿病に罹患しており、その数は、数年後には、１０００万人に達するであろうと考えられている。

【 0 0 0 2 】

臨床的に現在行われている糖尿病および前糖尿病状態の診断方法は、空腹時の血糖値測定と75g経口糖負荷試験における糖負荷後1時間および／または2時間の血糖値測定によって行われるが、1回の診断について血液を複数回採取する必要があるため、被験者に苦痛を与えるものである。また、糖尿病の重症度の診断にはHbA1c（グルコヘモグロビン）濃度が広く用いられている。HbA1cはヘモグロビンが血中のグルコースと非酵素的に結合したもので、血中のグルコース濃度に依存して生成するため、検査時点以前の1～2か月間の血糖値を反映し、一時的な生理状態に左右されない。そのため糖尿病の重症度を正確に表し、血糖コントロールの良い指標となるため、糖尿病の治療において欠かせない指標となっている。

【 0 0 0 3 】

糖尿病の治療においては病期の判断が重要であるが、上記の方法を含む臨床的所見によって総合的に病期の判断がなされるものであり、十分な客観性を有しているとは言いがたく、新たな指標に基づく診断方法が望まれている。

糖尿病は代謝疾患の一種で、慢性高血糖を特徴とするが、そのほかにも糖代謝、脂質代謝、蛋白代謝等に特徴的な異常がある。

【 0 0 0 4 】

例えば、I 型糖尿病においては、レチノールの血中濃度が健常人よりも低下する傾向が認められる（例えば、非特許文献 1、2 参照）。これに対して II 型糖尿病においてはレチノールの血中濃度が健常人よりも上昇する傾向が認められることが知られている（例えば非特許文献 3、4 参照）。しかし、レチノールの血中濃度と糖尿病およびその合併症との関係は明らかではない。

【 0 0 0 5 】

近年、脂肪の分解に関与している細胞内小器官のひとつであるペルオキシゾームを、増殖作用を有する化合物によって活性化させる核内レセプターとして *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR) が同定された。この PPAR は *retinoid X receptor* (RXR) と二量体を形成して遺伝子の転写因子として作用することが知られている (例えば、非特許文献 5 参照)。PPAR には α 、 β 、 γ の 3 種のサブタイプが知られているが、特に PPAR γ は脂肪細胞の分化に重要な役割を果たしており、さらに糖尿病患者のインシュリン感受性を上昇させる作用を有していることが明らかとなっている。PPAR γ の生体内での生理的リガンドは未だ不明であるが、RXR についてはレチノールの代謝産物の一つである 9-シス-レチノイン酸が生理的リガンドと考えられている。また、同じくレチノールの代謝産物の一つであるオールトランスレチノイン酸は脂肪細胞の分化を阻害する因子と考えられている (例えば、非特許文献 6、7 参照)。

【非特許文献1】 To h o k u j o u r n a l o f e x p e r i m e n t a l m 50

medicine, 1986年, 第149巻, p. 133-143。

【非特許文献2】The American journal of clinical nutrition, 1989年, 第50巻, p. 329-331。

【非特許文献3】International journal for vitamin and nutrition research = Journal international de vitaminologie et de nutrition, 1991年, 第61巻, p. 328-333。

【非特許文献4】American journal of the medical sciences. N. S., 1995年, 第310巻, p. 177-182。

【非特許文献5】Nature, 2000年, 第405巻, p. 421-424。 10

【非特許文献6】Differentiation, 1982年, 第23巻, p. 164-169。

【非特許文献7】Molecular and cellular biology, 1997年, 第17巻, p. 1552-1561。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、糖尿病の診断に有用な新規の因子を見出すことであり、これを用いた臨床的に有用な糖尿病診断方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。 20

【0008】

すなわち、血中レチノイン酸濃度を指標とすることを特徴とする糖尿病の診断方法である。

【0009】

さらに、該レチノイン酸がオールトランスレチノイン酸であることを特徴とする糖尿病診断方法である。

【0010】

【発明の実施の形態】レチノールの活性代謝物であるレチノン酸は生体内で重要な役割にもかかわらず、血中レチノン酸濃度と糖尿病の関係についてはなんらの検討もなされてこなかった。本発明者らは血中レチノイン酸濃度と糖尿病の病態に一定の関係が見られることを突き止め、血中レチノイン酸濃度の測定することを特徴とする糖尿病の診断方法を完成した。すなわち、糖尿病患者の血中のレチノイン酸濃度を測定することにより、糖尿病の進行の程度および重症度が予測でき、治療方法の選択に有用な情報を得ることができる。 30

糖尿病の進行の程度とHbA1c濃度との相関関係はよく知られている。レチノイン酸濃度とHbA1c濃度が相関することから、レチノイン酸濃度が糖尿病の進行の程度と相関することが明らかとなった。こうしてレチノイン酸濃度の測定による糖尿病の進行程度を診断する新規で有用な本発明の診断方法が完成された。

血中のレチノイン酸濃度の測定方法としては、当業者にとってはいろいろな方法が考えられる。高速液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)、または、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による方法が簡便、高感度、かつ高精度であり好ましい。ガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー(GC-MS)による測定も測定サンプルの誘導体化が不可欠ではあるが、高感度かつ高精度である。また、抗原抗体反応を用いる蛍光分析も実用的である。 40

【0011】

HPLCによる血中レチノイン酸濃度の測定に際しては、測定対象となる血液を適当な方法によって前処理してから測定を行うことも可能である。前処理を行うことによって、より高感度かつ、より高精度な測定が可能となり好ましい。前処理においては、遠心分離、有機溶剤等による除蛋白、有機溶剤による抽出、酸または塩基による振分け、アミノプロピルカラムの利用等の既知の方法を任意に組み合わせることができる。 50

【0012】

HPLCに用いるカラム担体としては順相系、逆相系いずれでも用いることができるが、ODSカラム等の逆相系の方が分離が良好であり好ましい。

【0013】

HPLCにおける検出方法としては、既知の検出方法のいずれでもよいが、紫外線の吸収、または蛍光測定による方法が簡便かつ高感度であり好ましい。また、レチノイン酸を誘導体化することで、吸収強度、吸収波長、および蛍光強度等を変化させることで選択性および感度を向上させることもできる。

【0014】

以下に本発明における血中レチノイン酸濃度の測定による糖尿病の診断方法について具体例により詳細に説明するが、本発明は具体例に限定されるものではない。

10

【0015】

【実施例】

(1) 血清の調製

積水化学インセパック（凝固促進剤（トロンビン）、血清分離剤入り）に血液約10mlを採取し、室温で1時間程度放置後4℃で3000rpm、10分間遠心し血清をポリプロピレンチューブに移した。そのうち1mlを用いて以下に述べる抽出方法によって直ちに抽出、または-20℃で数日保存後抽出した。

【0016】

(2) 抽出操作

以下の操作においてはサンプルを遮光条件下にて取り扱った。血清1mlをアルゴンガス置換した10mlのネジキャップ付褐色試験管にとり、エタノール2mlを加えボルテックス後、室温で1800rpm、5分間遠心分離した。上清をあらかじめ100mM酢酸アンモニウム水溶液（pH4.5）2mlを入れアルゴンガス置換した10mlのスリ付試験管に移した。そこにn-ヘキサン／酢酸エチル（9／1）5mlを加え、激しく振り混ぜた後室温で1800rpm、3分間遠心分離し、試験管をドライアイスを入れたアセトンに漬け水層を凍らせた。有機層をn-ヘキサン／酢酸エチル（9／1）2mlでコンディショニングしたアミノプロピルカラム（ISOLUTE NH₂、500mg／3ml、International Sorbent Technology、UK）にのせ、n-ヘキサン／酢酸エチル（9／1）2ml、クロロホルム／2-プロパノール（2／1）2mlで2回、ジエチルエーテル1mlで順次洗浄した後、3%酢酸を含むジエチルエーテル2mlでレチノイン酸を溶出させた。この画分をアルゴンガス気流下で濃縮、乾燥した。ここにエタノール50μlを加えて溶解し、HPLCにて分析した。

20

30

【0017】

(3) HPLC分析

HPLC分析は島津製作所製LC-10ASポンプに紫外線検出器（島津製作所、SPD-10A）とインテグレータ（島津製作所、CR-8A）を接続して行った。カラムはCOSMOSIL 4C18-AR-II（250×4.6mm、5μm、ナカライテスク製）を室温にて用いた。

【0018】

移動相としては、溶媒A：アセトニトリル／メタノール／2%酢酸（60／16／24、v／v／v）および溶媒B：アセトニトリルを用い、グラジエント組成（溶媒Bの含有量）、0%（0-8分）、0-60%（8-14分）、60-70%（14-16分）、70%（16-38分）にて、流速0.6ml／分にて溶出した。検出は345nmにて行った。

40

【0019】

(4) レチノイン酸の定量

検量線はレチノイン酸標品を血清に添加、回収して作成した。分散係数は10%以下で良好な直線性（R²>0.999）が得られた。レチノイン酸の抽出効率80%と推定され、定量限界（LOQ）および検出限界（LOD）はそれぞれ、オールトランスレチノイ

50

ン酸の場合：0.27 ng/ml、0.08 ng/ml、13-シスレチノイン酸の場合：0.44 ng/ml、0.13 ng/ml、9-シスレチノイン酸の場合：0.22 ng/ml、0.07 ng/mlと推定された。

【0020】

(5) 生化学的検査

血糖値：採血直後に小型血糖測定機（電極：グルテストセンサー）により測定した。

【0021】

HbA1c、TC（総コレステロール）、HDL C（HDLコレステロール）、TG（トリグリセリド）、FFA（遊離脂肪酸）の定量についてはSRL, Inc.に依頼した。

【0022】

【測定例1】

健常者4名について血中レチノイン酸濃度の日内変動を3時間おきに4回測定した結果を表1に、健常者6名について血中レチノイン酸濃度の日間変動を3週間にわたって4回測定した結果を表2に示した。

【0023】

【表1】

血中レチノイン酸濃度の日内変動

	平均値（データ範囲）	変動係数 （SD）	p値
オールトランスレチノイン酸 （ATRA）	1.72 ng/ml （1.32-2.25）	19.7% （4.5）	0.51
13-シスレチノイン酸 （13cRA）	2.10 ng/ml （1.62-3.00）	11.8% （8.2）	0.053
血中グルコース（BG）	90.8 mg/dl （84-105）	5.3% （2.3）	0.54
トリグリセリド（TG）	76.3 mg/dl （42-137）	25.7% （4.5）	0.18
遊離脂肪酸（FFA）	0.45 mEq/l （0.12-1.16）	67.1% （13.2）	<0.0001

10

20

30

【0024】

【表2】

血中レチノイン酸濃度の日間変動

	平均値 (データ範囲)	変動係数 (SD)	p 値
オールトランスレチノイン酸 (ATRA)	1. 81 ng/ml (1. 40-2. 34)	11. 0% (4. 5)	0. 74
13-シスレチノイン酸 (13cRA)	1. 95 ng/ml (1. 61-2. 31)	8. 4% (4. 7)	0. 90
血中グルコース (BG)	92. 8 mg/dl (82-109)	6. 4% (1. 3)	0. 053
総コレステロール (TC)	185. 2 mg/dl (143-279)	6. 2% (5. 6)	0. 22
HDLコレステロール (HDL C)	65. 6 mg/dl (32-98)	6. 7% (3. 1)	0. 16
トリグリセリド (TG)	68. 6 mg/dl (38-143)	25. 5% (19. 2)	0. 071
遊離脂肪酸 (FFA)	0. 38 mEQ/l (0. 16-0. 68)	35. 3% (13. 4)	0. 31

10

20

【0025】

【測定例2】

健常者18名、II型糖尿病患者13名についての血中レチノイン酸濃度の測定結果を表3、表4に示した。

【0026】

【表3】

	健常者	糖尿病患者	p 値
性別 (男性/女性)	14/4	11/2	
年齢	32.8±7.9 (n=18)	56.7±15.5 (n=13)	0.0001
BMI (KG/m ²)	21.2±1.7 (n=18)	22.7±4.3 (n=13)	0.286
総コレステロール (TC) (mg/dl)	190±33 (n=17)	186±33 (n=13)	0.756
HDLコレステロール (HDL C) (mg/dl)	63.5±11.3 (n=17)	54.4±12.4 (n=11)	0.057
トリグリセリド (TG) (mg/dl)	136±273 (n=16)	118±81 (n=13)	0.077
血中グルコース (BG) (mg/dl)	98.5±7.0 (n=17)	139±33 (n=13)	0.006
HbA1c (%)	4.59±0.14 (n=7)	6.75±1.24 (n=13)	<0.0001
オールトランスレチノ イン酸 (ATRA) (ng/ml)	2.08±0.53 (n=18)	1.76±0.54 (n=13)	0.092
13-シスレチノイン 酸 (13cRA) (ng/ml)	2.05±0.26 (n=18)	1.77±0.39 (n=13)	0.093
ATRA+13cRA (ng/ml)	4.13±0.61 (n=18)	3.54±0.86 (n=13)	0.033

10

20

30

【0027】

【表4】

変数1	変数2	相関係数 (r)
年齢	ATRA	-0.69*
年齢	13cRA	-0.52
年齢	HbA1c	-0.24
HbA1c	ATRA	0.57*
HbA1c	13cRA	0.62*
HbA1c	BG	0.37
HbA1c	TC	0.61*
HbA1c	HDLC	0.15
ATRA	TC	0.43
ATRA	HDLC	0.29
ATRA	13cRA	0.74**
13cRA	TC	0.31
13cRA	HDLC	0.61

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

10

【0028】

【発明の効果】表1および表2より、変動係数を比較するとレチノイン酸の血中濃度の日内および日間変動は、血中グルコース、総コレステロールおよびHDLコレステロールの血中濃度と同程度に安定している。一方、トリグリセリドと遊離脂肪酸の濃度変動はレチノイン酸の濃度変動よりも大きい。すなわち、レチノイン酸の血中濃度変動は、日内および日間ともに低く抑えられており、疾病診断の指標として有用である。

20

【0029】

さらに、表3より、II型糖尿病患者の血中レチノイン酸濃度は、健常者よりも低い傾向がある。しかし、これはII型糖尿病患者群と健常者群の年齢構成の差異によることを否定できない。他の脂肪類の指標には年齢構成による差異は認められない。

30

【0030】

表4より、糖尿病の指標として用いられているHbA1c濃度とレチノイン酸の血中濃度には相関が認められる。すなわち、一般にHbA1c濃度は糖尿病の進行程度および重症度と関係があるとされていることから、レチノイン酸濃度が糖尿病の進行程度および重症度と関連することがわかる。ここでHbA1c濃度は総コレステロールと相関が認められるが年齢とは相関が認められない。

【0031】

また、レチノイン酸の血中濃度と他の血中脂肪指標とは特に相関が認められない。以上の結果より、血中レチノイン酸濃度は、これまでに知られていない新たな糖尿病診断の指標として有用であることが明らかとなった。

40

フロントページの続き

F ターム(参考) 2G045 AA13 BA10 BB03 BB10 BB48 BB51 CA25 CA26 DA57 FA27
FA29 FB06 GC10